User Guide

version 1.3

はじめに

Realtime stain は革新的な、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）用に最適化した、タンパク質の可視化とサンプルローディングバッファー両方の目的でご利用できる製品です。Realtime stain はタンパク質のアミン基特異的に結合し、現在よく利用されている後染め手法の代替手段を提供します。単純にユーザーのタンパク質サンプルに（1：1の比率で）加えて加熱するだけで、ゲル中をタンパク質が泳動していく状態を“リアルタイム“で観察できます。単純なプロトコールはサンプル標識化効率の最適化とカスタマイズに適応できますので、ご自身でオリジナルのプロテインマーカーを作成する手段も提供します。Realtime Stain は現在のところ純度の高い精製タンパク質、部分精製されたタンパク質、組み換えタンパク質断片、FPLC フラクション、抗体への利用に最適化されています。

保存、有効期限

Realtime stain は室温で保存してください。有効期限は製造から 1 年です（製品記載の有効期限をご確認ください）。製品溶液は低温で析出する場合があるので、その場合は 30～40℃で 1 分弱加熱して完全に溶解させてから使用してください。

製品添付の BSA 凍結乾燥品は室温で保管し、有効期限内にご利用ください。プロトコール通り溶解させた場合は（25mg/ml）、小分けして-20℃で保管してください。

製品内容

- 2ml または 0.2ml Realtime Stain 溶液（青キャップ）× 1
- 5mg BSA（赤キャップ）× 1
- ホワイトスクリーン（10cm × 10cm）× 1
- ホワイトスクリーン（8cm × 10cm）× 1
- Vivaspin 20:10,000Da MWCO × 1（2ml 製品のみ）
- ユーザーガイド（英文、和文（本紙））
- イージーガイド（英文）

必要な機材（本製品外）

- ドライヒートブロック
- 還元剤（step-1、step-2 で使用）
- 微量遠心機
- 高速冷却遠心機（オリジナルプロテインマーカー作成時のみ）
- サンプルローディングバッファー（オリジナルプロテインマーカー作成時のみ）
- SDS-PAGE システム

ご使用前に:

Realtime stain は 2 倍濃縮溶液です。タンパク質試料の溶解に利用されるバッファーの一部と添加剤は標識化効率に影響を与えますので、表1を参考に事前に標識化効率を確認していただくことが重要です。もしバッファー適合性テストで標識化効率に影響がないことが認められましたら、標準プロトコールの通り Realtime stain とタンパク質試料を1：1の比率で混合してください。ホワイトスクリーンはコントラストを付けて泳動中にバンドを見やすくするためのものです。詳しくは取り付け方法を参照してください。

表1：Realtime stain のバッファー互換性

バッファー	濃度.	標識化効率	バッファー	濃度.	標識化効率
Tris	< 50mM > 100mM	100% 55%	Imidazole	<50mM 100mM 150mM 200mM	75 – 100% 55% 25% 15%
NaCl	0.5M	100%	Glycine	50mM 100mM	25% 10%
2-ME & DTT	<10mM (Step-1) >10mM (Step-2)	100% 100%	Urea	4M	100%

ME: メルカプトエタノール

バッファー適合性テスト

製品にはタンパク質試料溶液のバッファーが Realtime stain 使用に適合できるかを事前に評価できるよう、BSA 凍結乾燥品 5mg が添付しています。アミンを含むいくつかのバッファーは、標識化効率に影響がでます。Realtime stain での最適な結果を得るために Generon 社では事前に下記のテストでバッファーの適合性を確認することを推奨します。

1. 5mg BSA を 200µｌのミリ Q 水に溶解して、ストック溶液（最終濃度 25mg/ml）を調製します（溶液を保存する場合は、小分けして-20℃で保管します）。
2. ストック溶液 1µｌを評価するバッファー9µｌに加え、そこに 10µｌの Realtime stain を加えます。
3. コントロール試料としてストック溶液 1µｌを 1×PBS または 20mM Tris-HCl pH7.5 9µｌに加え、そこに 10µｌの Realtime stain を加えます。
4. ドライヒートブロックを使い、100℃で 10 分加熱します。
5. 4µｌを SDS-PAGE ゲルで泳動します。

バッファー中に互換性のない成分があると、標識化効率を著しく低下させて、BSA のバンド強度が低下します。そのような場合は Realtime stain のご利用前にそのバッファーをミリ Q 水または利用可能なバッファーで 2～5 倍希釈するか、バッファー交換することを推奨します。

標準プロトコール

Step-1: 還元剤なし、または<10mM 2-メルカプトエタノール(ME) / DTT を含む場合

1. 5µ l の Realtime stain を 5µ l のサンプルに加えます。（必要でしたら 10mM までの 2-ME または DTT を加えることができます）
2. ドライヒートブロックで 100℃、10 分加熱します。加熱後、軽く遠心して溶液を回収します。濃度の高い還元剤が不要な場合、3.、4.をスキップします。

Step-2 （オプション）: >10mM 2-ME / DTT が必要な場合

3. 2. の処理の終わった溶液に、必要量の還元剤を追加で加えます。
   (0.5µ l の 1 - 2M の 2-ME または DTT は、最終濃度 50 - 100mM になります)
4. ドライヒートブロックで 100℃、3 分追加で加熱します。加熱後、軽く遠心して溶液を回収します。
5. 5µ l をゲルのウエルにロードします。
6. ゲル、装置のメーカーの取扱説明に従い泳動します。

プロトコール：オリジナルプレステインドプロテインマーカーの作成

スタンダードとして利用するタンパク質への標識化効率は、上記の標準プロトコールを使い事前に確認することを推奨します。

1. 20µ l のタンパク質溶液に、20µ l の Realtime stain を加えます（必要でしたら 10mM までの 2-ME / DTT を加えることができます）。マーカーに利用する各スタンダードの溶液についてこの操作を行います。
2. ドライヒートブロックで、100℃、10 分加熱します。加熱後、軽く遠心して溶液を回収します。
3. 各スタンダードの溶液を等量ずつ混合します。
4. 2ml 製品に付属の Vivaspin 20, 10,000Da MWCO を使用し、20mM Tris pH7.5 か PBS pH 7.4 にバッファー交換します。
   (200 倍または 2 ×5ml のバッファー交換が必要です。最終液量はスタート時の 20µ l です。
5. ご利用中のサンプルローディングバッファー（キットには含まれません）を規定量加えます。保存は小分けして -20℃で行います。
6. 利用時は、5 -10µ l を取り、ドライヒートブロックで 100℃、3 分加熱します。加熱後、軽く遠心して溶液を回収します。
7. 5 - 10µ l をゲルのウエルにロードします。

最適な結果には、各スタンダードのタンパク質を個別に標識化反応してから混合し、未反応の色素を除きます。バッファー交換後の溶液で、各スタンダードの最終タンパク濃度が 1- 2mg/ml になるように調製します。

Note: このプロトコールは、泳動のフロントラインにある色素を減らし、通常のサンプルローディングバッファー利用時にフロントラインにマスクされる 10 - 15kDa 程度の低分子量タンパク質にも適用できるよう、タンパク溶液から未反応の色素を除くように作られています。

Note: このプロトコールで作成したプロテインマーカーは、Realtime stain に適合するサンプルローディングバッファーとゲルバッファー系を利用する場合、すべての SDS-PAGE 系で利用可能です。

SDS-ポリアクリルアミドゲル適合性

Realtime stain は Tris-Glycine、Tris-HEPES、Bis-Tris 系のプレキャストまたは自作 SDS ポリアクリルアミドゲルで試験済みです。現在のところ、上記以外のバッファー系のゲルでも問題は報告されていませんが、そのような系については Generon 社では Realtime stain の評価を行っていません。

テクニカルデータ

各タンパク質の標識化効率は、標識反応パラメーター（時間、温度、還元剤）の調整によって最適化できます。次ページのグラフは製品添付の BSA を利用して得られた結果です。

図1A－D

BSA を利用した Realtime stain の標識化効率

全てサンプルはプロトコールに従い調製し、5µ g BSA を NuSep 4-20% Tris-Glycine SDS PAGE プレキャストゲルにロードして、170V で泳動しました。各ゲルは乾燥させてから落射タイプの照明を使い撮影し、バンド強度を Image J ソフトウェアで測定しました。

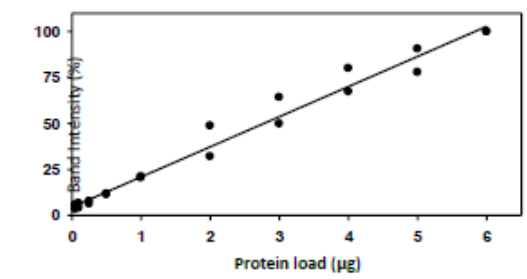
(A): 非還元状態、100℃で 10 分間加熱時の標識化効率

(B) 非還元状態で、温度と加熱時間を変更したときの標識化効率の変化。推奨の 100℃、10f 分での結果をハイライト表示してあります。

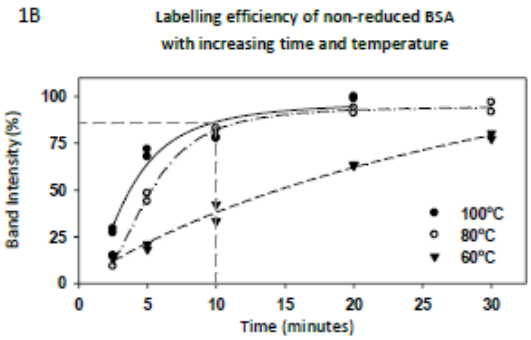
(C): 標準プロトコールの Step-1 における 100℃、10 分の加熱条件での各種還元剤による標識化効率の変化

(D): 各還元剤を 50mM 含む溶液で標準プロトコールの Step-1、Step-2 での標識化効率。

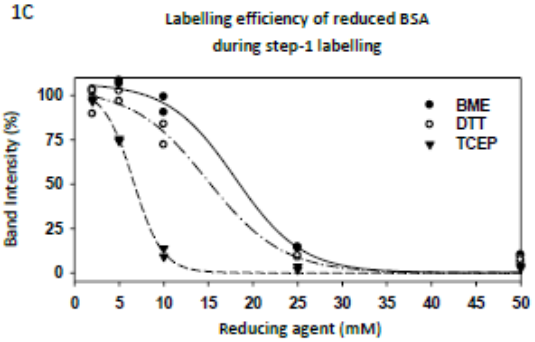
1A



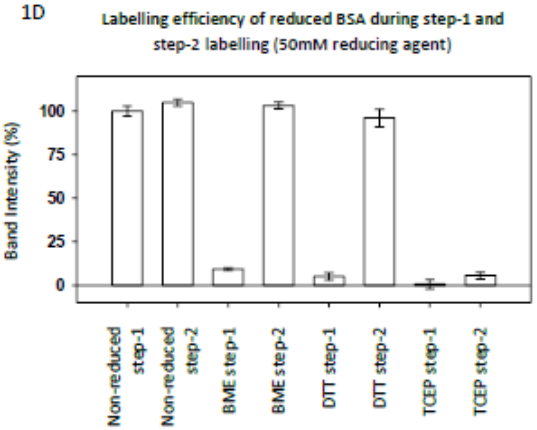
1B



1C



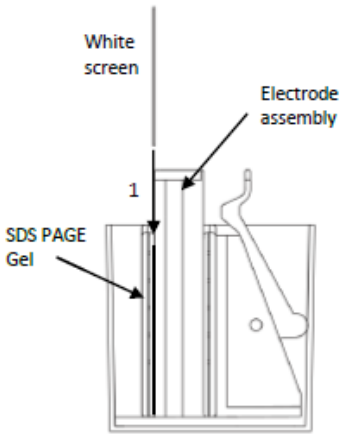
1D



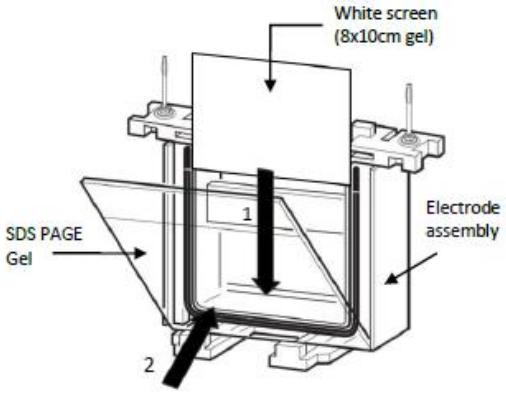
ホワイトスクリーンの利用法

付属のホワイトスクリーンは泳動中のバンドを見やすくするためのものです。代表的な電気泳動システムでの利用方法について解説します。

Life Technologies 社 Xcell SureLock® Mini-Cell: 装置の取扱説明書に従いゲルとタンクを組み立てます。サンプルローディングの前に、ゲルサイズに合ったホワイトスクリーンをゲルカセットと電極アセンブリーの間に挿入します。



Bio-Rad 社 mini-PROTEAN: 8×10cm のホワイトスクリーンをガスケットの内側の電極アセンブリー上に置きます。つぎにゲルカセットを固定します。この過程でガスケットのゲルカセットとのシール部分を壊さないようにします。



トラブルシューティング

トラブル	可能性のある原因	対処法
バンドが見えない、または非常に薄い	適合しない成分がバッファーに含まれる。	バッファー適合性テストで適合しない成分がないか確認する。
		バッファーを 2 – 5 倍希釈するか、バッファー交換を行う。
	Step-1 の標識化反応で、10mM 以上の還元剤が利用された。	還元剤は Step-2 で加えるようにする。
	5mM 以上の TCEP が Step-1 の反応で利用された。	高濃度の TCEP は不適なので、2-ME か DTT を利用する。
	50mM 以上の TCEP が Step-2 の反応で利用された。	2-ME か DTT を利用する。
	タンパク質濃度が低い。	ゲルへのロード量を 10μl に増やす。
		標識反応時間を延長し、標識化反応を最適化する
		Realtime stain を加える前に、タンパク質溶液を濃縮する。
	タンパク質のアミノ基が限定的。	反応時間を延長し、アルギニン残基とリシン残基で補うようにする。
	標識反応中に試料が乾燥した。	長い反応時間には反応液量を増やす。例）100℃、10 分の反応の場合、試料、Realtime stain をそれぞれ 20μl にする。
	ヒートブロック故障	ヒートブロックの温度を確認する。
低分子量（<10 – 15kDa）のタンパク質が見えない。	タンパク質がフロントラインの色素と一緒に移動している。	プレステインマーカー作成のプロトコールを参照して、余分な色素を取り除きます。
フロントラインの色素がブロードになる。	ロード量が多すぎる（10μl 以上）。	ロード量を 10μl 未満に減らします。必要ならばタンパク質濃度を上げます。
	Realtime stain を高温(100℃)で長時間加熱を続けると、フロントダイがブロードになる場合がある	Realtime stain の不可逆的変化です。
バッファー適合性テストで、コントロールの BSA のバンドが見えない、または非常に薄い。	ヒートブロックの故障	ヒートブロックの温度を確認します。
	BSA ストック溶液を繰り返し凍結融解した。	新しい BSA 溶液を用意します。
	適合しないバッファーを使用した。	新しい BSA 溶液を用意します。コントロール用には PBS pH 7.4 または 20mM Tris pH7.5 で希釈します。
オリジナルプロテインマーカーの分離が悪い。	遠心中にサンプルが熱を持った。	冷却遠心機を使用し4℃で再度遠心します。
	標識化効率が悪い。	プロテインマーカー作成の前に、標準プロトコールを使用して利用するタンパク質について反応の温度、時間を調整します。
	バッファー成分が適合していない。	バッファー適合性テストで現在のバッファーが適合できるか確認します。
Realtime stain が析出している。	低温で保管していた（冷蔵庫などで）	Realtime stain を 30 – 40℃で短時間加温してからよく混合して再溶解させます。使用前に毎回加温する必要はありません。
セルライゼート、血清を試料としたときバンドが不鮮明。	複雑なタンパク質混合溶液には未対応です。	通常のサンプルローディングバッファーを使用し、染色には Quick Coomassie(p/n GEN-QC-Stain)を使用してください。

お問い合わせ先：

株式会社エムエステクノシステムズ

東日本： 〒162-0805 東京都新宿区矢来町 113

TEL：03-3235-0673 FAX: 03-3235-0669

西日本： 〒532-0005 大阪市淀川区三国本町 2-12-4

TEL：06-6396-6616 FAX: 06-6396-6644

Mail : technosales@technosaurus.co.jp

URL: http://www.mstechno.co.jp